

**Poly A-Polymerase und
tRNAadenylyl(cytidylyl)transferase aus
Escherichia coli:
Verhalten gegen tRNA und tRNA-Fragmente**

Rolf Rüdiger Massmann

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie
8033 Martinsried bei München
Abteilung für Organische Chemie und Spektroskopie
Direktor: Professor Dr. Heinz Dannenberg

Vorgelegt über das Institut für Tierphysiologie
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. Dr. Dr. h.c. Dr. h.c. J. Brüggemann

Poly A-Polymerase und tRNAadenylyl(cytidylyl)transferase

aus Escherichia coli:

Verhalten gegen tRNA und tRNA-Fragmente

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Rolf Rüdiger Massmann

aus Istanbul

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München



Dekan: Professor Dr. E. Dahme
Referent: Professor Dr.Dr.Dr.h.c.Dr.h.c. J. Brüggemann
Korreferent: Universitätsdozent Dr. K. Tempel

Tag der Promotion: 23. Februar 1973

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Inhaltsverzeichnis

A.	Einleitung	1
B.	Problemstellung	4
C.	Material und Methoden	9
D.	Ergebnisse und Diskussion	28
E.	Zusammenfassung	43
F.	Literatur	49
G.	Lebenslauf	53

Abkürzungen und Erläuterungen:

AMP:	Adenylsäure
GMP, Gp:	Guanylsäure
ATP:	Adenosintriphosphat
CTP:	Cytidintriphosphat
O.D.:	Optische Dichte bei der Wellenlänge 260 μ
O.D. ₂₆₀ :	Optische Dichte bei der Wellenlänge 260 μ
PP:	Pyrophosphat
S.D.:	Säulendimensionen (l / $\emptyset$)
Tris:	Trishydroxymethyl-aminomethan
E.coli:	Escherichia coli
RNase:	Ribonuklease
Upm:	Umdrehungen pro Minute
cpm:	counts per minute = gezählte Impulse pro Minute
MG:	Molekulargewicht
TCA:	<u>tr</u> ichloracetic <u>a</u> cid = Trichloressigsäure
DEAE-Zellulose:	Diäthylaminoäthyl-Zellulose (schwach basischer Ionenaustauscher auf Zellulosebasis)
Sucrose:	Rohrzucker
CCA-Enzym:	tRNAadenylyl(cytidylyl)transferase, E.C.2.7.7.25.
tRNA:	transfer-Ribonukleinsäure
tRNA ^{Tyr} _{E.coli} :	tyrosin-spezifische tRNA (aus E.coli)

$\text{tRNA}_1^{\text{Tyr}}$, $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$: E. coli enthält zwei verschiedene tyrosinspezifische tRNAs, die in der Reihenfolge ihrer Elution von DEAE-Sephadex A-50 (Abb. 4) durch Indizes als Spezies 1 und Spezies 2 bezeichnet werden

$\text{tRNA}_{\text{pCpC}}^{\text{Tyr}}$: tyrosinspezifische tRNA ohne 3'-terminales AMP

$\text{tRNA}_1^{\text{fMet}}$, $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$, $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$: E. coli enthält 3 verschiedene methioninspezifische tRNAs, die in der Reihenfolge ihrer Elution von BD-Zellulose (Abb. 5) durch Indizes als Spezies 1, 2 und 3 bezeichnet werden. Die Spezies 1 ist die formylierbare Initiator-tRNA der Proteinbiosynthese ($\text{tRNA}_1^{\text{fMet}}$)

Schmelzpunkt: Unter dem Schmelzpunkt von Nukleinsäuren versteht man die Temperatur, bei der doppelsträngige (helikale) Strukturen in Einzelstrangstrukturen übergehen. Dieser Vorgang ist mit einer Erhöhung der optischen Dichte verbunden.

A. Einleitung

Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA) stellt das genetische Material der Zelle dar. Diese DNA hat zwei übergeordnete Funktionen: sie sichert die Weitergabe der genetischen Information an die Nachkommen, indem sie als Matrice für die Synthese identischer Tochter-DNA fungiert. In diesem Prozess, der als Replikation bezeichnet wird, dient die DNA der Erhaltung der Art und Eigenart eines Organismus.

Zum zweiten dient die DNA der Erhaltung des individuellen Lebens einer Zelle, indem sie die Informationen für die Synthese aller Zellbestandteile zur Verfügung stellt (Abb. 1). Der erste Schritt dieses Prozesses ist das Kopieren von DNA-Sequenzen in RNA-Sequenzen (Transkription). Produkte dieses Vorgangs sind drei Sorten von RNA: messenger - oder Boten - RNA (mRNA), ribosomale RNA (rRNA) und transfer-RNA (tRNA). Der tRNA kommt die Funktion zu, die aktivierten Aminosäuren für die Synthese der Proteine (gemäß der Nukleotidsequenz der mRNA) in der richtigen Reihenfolge zur Verfügung zu stellen. Die Verknüpfung der Aminosäuren zum Protein wird von den Ribosomen katalysiert, die zu ca. 50 % aus rRNA bestehen. Die drei unmittelbaren Genprodukte

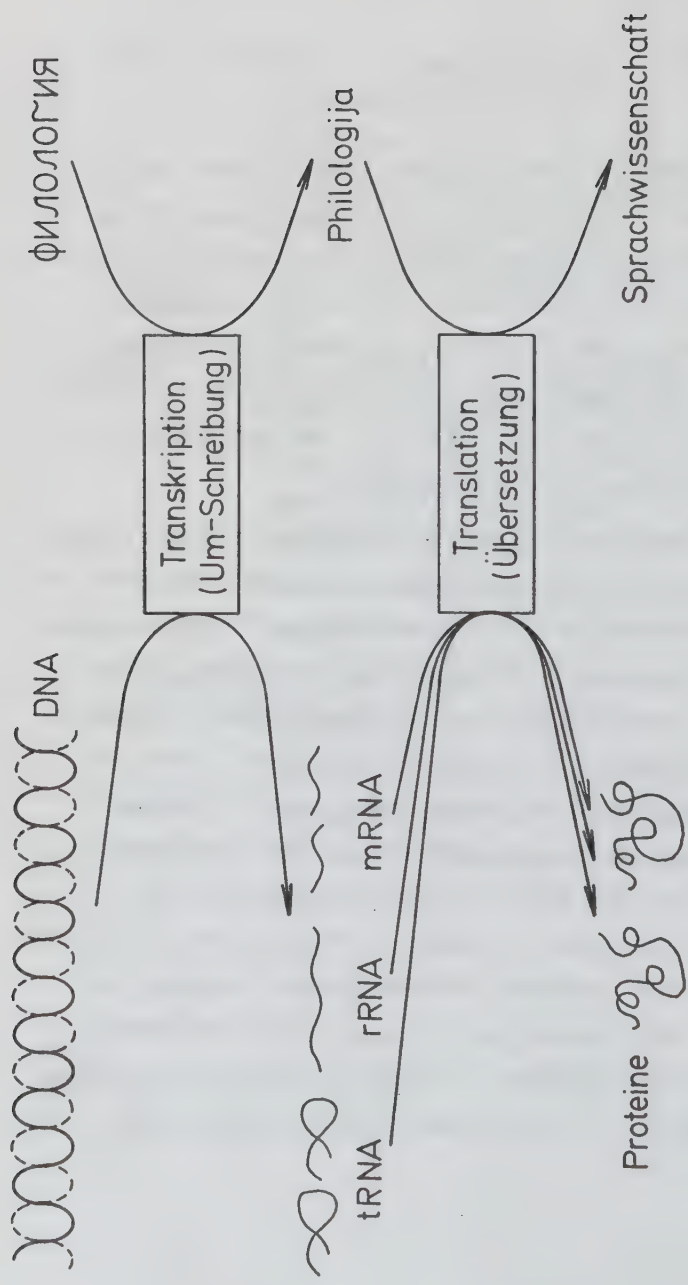


Abb. 1: Transkription und Translation in der Molekularbiologie und in der Linguistik.

(mRNA, rRNA, tRNA) treten also in eine enge Wechselwirkung, um die Biosynthese der Proteine zu ermöglichen. Die Übersetzung von RNA-Sequenzen in Proteinsequenzen wird als Translation bezeichnet.

Die Bezeichnungen für die beiden wichtigsten Prozesse, die der Erhaltung der individuellen Funktion einer Zelle dienen, Transkription und Translation, sind nicht ohne Grund von der Linguistik übernommen worden: Die Um-Schreibung von DNA-Sequenzen in RNA-Sequenzen entspricht der Um-Schreibung z.B. eines russischen Textes in die entsprechende lateinische Buchstabenfolge; die Übersetzung von RNA-Sequenzen in Protein-Sequenzen entspricht der Übersetzung des "latinisierten" russischen Wortes in die deutsche Sprache (Abb. 1).

B. Problemstellung

Die Funktion von transfer-RNA ist soeben angedeutet worden, ihre Struktur ist nicht weniger kompliziert als jene. tRNAs bestehen aus einer einsträngigen Kette von Ribo-Nukleotiden, die durch eine 5'-3'-Bindung miteinander verknüpft sind. Alle bisher bekannten tRNAs sind durch Wasserstoffbrückenbindung in bihelikalen Bereichen derart gefaltet, daß die sogenannte Kleeblattstruktur zustande kommt (Abb. 2). Außer den vier normalen Nukleotiden (Adenylsäure, Cytidylsäure, Guanylsäure und Uridylsäure) findet man in den verschiedenen tRNA-Spezies eine Anzahl sog. seltener Nukleotide. Diese werden nicht als solche bei der Biosynthese der tRNA in die Sequenz eingebaut, sondern werden durch die Einwirkung spezifischer Enzyme auf "jungfräuliche" tRNA (das unmittelbare Genprodukt) erzeugt.

Die 3'-Hydroxylgruppe des 3'-terminalen Adenosins ist der Bindungspart für die aktivierte Aminosäure, und die Struktur dieses Bereiches ist bei allen bisher sequenzierten tRNAs identisch: alle enthalten eine 3'-terminale CCA-Sequenz. Zu Beginn dieser Doktorarbeit lagen Versuche vor, aus denen geschlossen wurde, daß die "jungfräuliche" tRNA, so wie sie von der DNA kopiert wird,

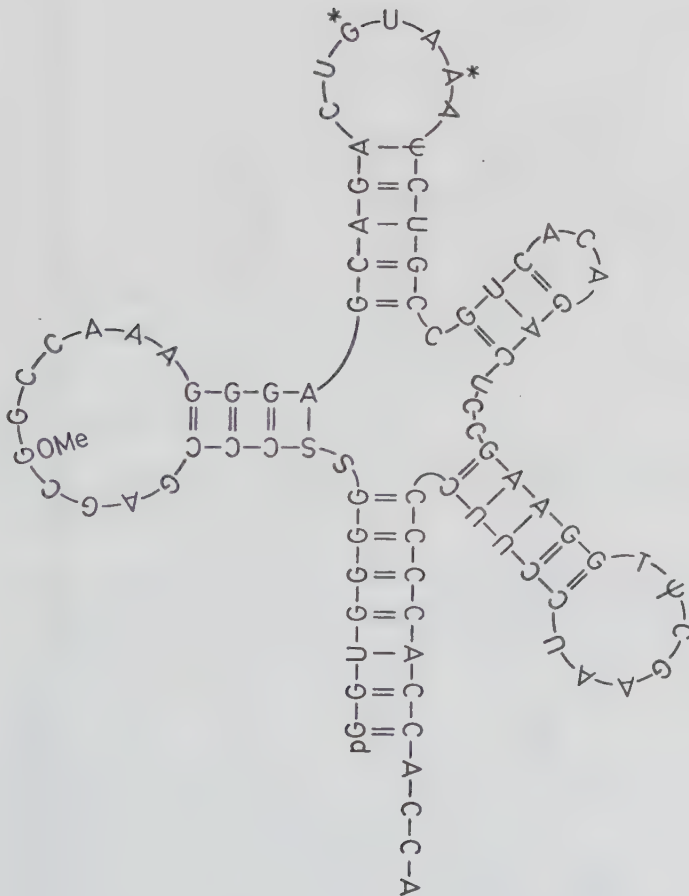


Abb. 1: Nukleotid-Sequenz und Faltung zur Kleeblattstruktur von tRNA₂^{Tyr}-(E.coli).

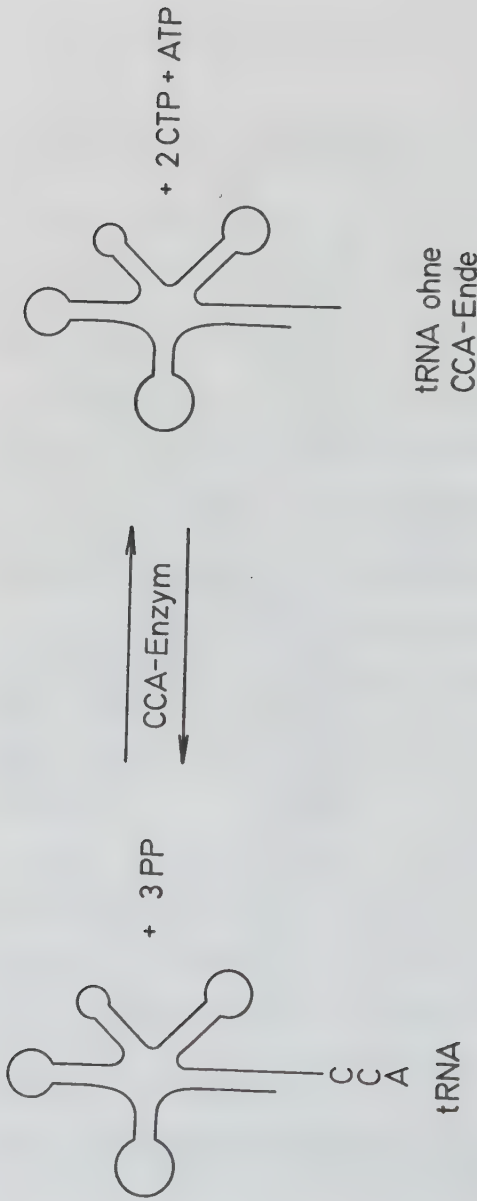


Abb. 3: "Pyrophosphorolyse" ($\rightarrow$) und Reparatur ($\leftarrow$) von "pyrophosphorylierter" tRNA durch CCA-Enzym.

nicht nur unmodifiziert d.h. ohne seltene Nukleotide sei, sondern daß auch die 3'-terminale CCA-Sequenz fehlen würde (1). Das hätte bedeutet, daß diese tRNA inaktiv wäre, d.h. keine Akzeptorfunktion für Aminosäuren hätte. Dadurch wäre dem Enzym, welches die CCA-Sequenz an die "jungfräuliche" tRNA anfügen würde, eine erhebliche Bedeutung, ja möglicherweise eine Schlüsselstellung bei der Regulation der Proteinsynthese in der Zelle zugekommen. Aus diesem Grund war es interessant, diejenigen Enzyme in E. coli, welche den CCA-Terminus von tRNA verändern können, zu untersuchen. Diese Enzyme sind

- a) die tRNAadenylyl(cytidylyl)transferase ("CCA-Enzym", E.C.2.7.7.25) und
- b) ein zweites Enzym mit ähnlichen Eigenschaften, welches kürzlich von Gross und Alberty als Poly A-Polymerase von noch unbekannter Funktion identifiziert worden ist (2).

Zu Beginn dieser Arbeit war lediglich die Funktion des CCA-Enzyms bekannt. Das Enzym, welches in E. coli (3, 4), Rattenleber (5), Hefe (6) und Kaninchenleber (7) gefunden worden ist, katalysiert in Gegenwart von Pyrophosphat die "Pyrophosphorolyse" von tRNA (Abb. 3), wodurch die 3'-terminale CCA-Sequenz unter Bildung von

2 CTP und ATP abgespalten wird. In Abwesenheit von Pyrophosphat, d.h. bei Inkubation von "pyrophosphorylierter" tRNA mit CTP bzw. ATP wird die CCA-Sequenz repariert, das Reaktionsprodukt ist tRNA mit intakter CCA-Sequenz.

Es war daher die Aufgabe gestellt, die beiden erwähnten Enzyme miteinander zu vergleichen hinsichtlich ihrer Reaktivität gegen tRNA, tRNA_{pCpC} und gegen tRNA-Fragmente von bekannter Sequenz. Voraussetzung für eine erfolgreiche Arbeit war

1. die Isolierung reiner tRNA von bekannter Sequenz,
2. die Gewinnung von tRNA-Fragmenten bekannter Sequenz,
3. die partielle Reinigung und Trennung der beiden Enzyme voneinander.

C. Material und Methoden

Bakterien: E.coli MRE 600 wurden von Boehringer Mannheim GmbH gekauft.

Transfer-Ribonukleinsäuren aus E.coli MRE 600 wurden nach der Vorschrift von Zubay präpariert (8). Aus diesem Gemisch von ca. 60 bis 80 tRNA Spezies wurden einige tRNAs in reiner Form isoliert. Zur Anwendung kam für diesen Zweck die Säulenchromatographie an DEAE-Sephadex A-50 (9) und an benzoylierter DEAE-Zellulose (10). Folgende tRNA-Spezies aus E.coli wurden rein isoliert: $\text{tRNA}_1^{\text{fMet}}$, $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$, $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$, $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$, tRNA^{Phe} , $\text{tRNA}_1^{\text{Tyr}}$ und $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$. Partiiell gereinigt wurden tRNA^{His} (50 % rein) und tRNA^{Arg} (30 % rein). Als Beispiel für die Isolierung reiner tRNA-Spezies wird die Reinigung von $\text{tRNA}_1^{\text{fMet}}$ und $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$ im folgenden beschrieben.

Fraktionierung von tRNA (E.coli) und Isolierung reiner $\text{tRNA}_1^{\text{fMet}}$ und $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$.

a) Chromatographie an DEAE-Sephadex A-50:
1,05 g (ca. 20.000 O.D.₂₆₀-Einheiten) unfraktionierte E.coli tRNA wurde in 0,02 m Trispuffer gelöst und auf eine mit DEAE-Sephadex A-50 gefüllte Säule von 150 cm Länge ($\varnothing$ 2 cm) aufgetragen. Die Elution erfolgte in

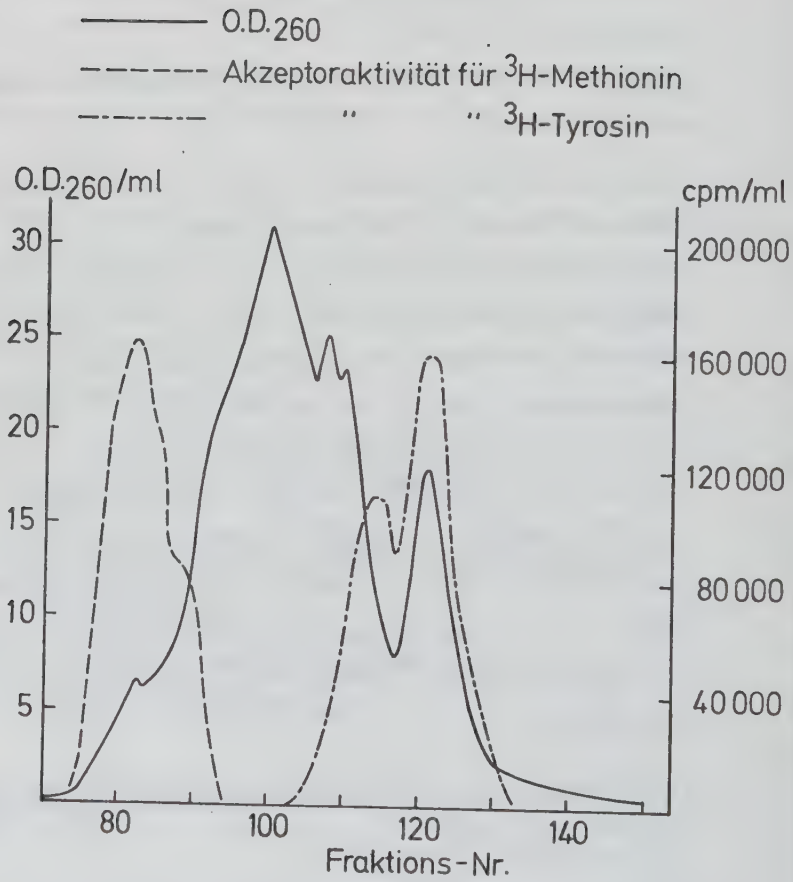


Abb. 4: Chromatographie von unfraktionierter E.coli-tRNA an DEAE-Sephadex A-50.

enger Anlehnung an die Vorschrift von Nishimura et al. (9) durch Anlegen eines linearen NaCl-Gradienten: das Gradientengefäß enthielt in der Mischkammer 1,5 l 0,375 m NaCl, 0,02 m Tris·HCl pH 7,5 und 0,008 m MgCl_2 . Die Vorratskammer enthielt 1,5 l 0,525 m NaCl, 0,02 m Tris·HCl pH 7,5 und 0,016 m MgCl_2 . Es wurden 155 Fraktionen zu je 20 ml gesammelt, von jeder zweiten Fraktion wurde die optische Dichte bei 260 μ (O.D.₂₆₀) gemessen (Abb. 4). Ein Aliquot (5 bis 30 μ l, entsprechend ca. 0,1 bis 0,2 O.D.₂₆₀-Einheiten von tRNA) von jeder Fraktion wurde nach Hoskinson und Khorana (11) mit Puffer, Mg^{++} , ATP, Aminoacyl-tRNA-Synthetase und einer ^3H -markierten Aminosäure 30' bei 37° C inkubiert. Danach wurde ein 100 μ l-Aliquot aus dem Inkubationsansatz entnommen und auf ein Rundfilter (24 mm ϕ) aufgetragen. Die mit der jeweiligen Fraktionsnummer versehenen Rundfilter wurden in eiskalte 5 %ige Trichloressigsäure (TCA) gebracht. Die Filter wurden nach Mans und Novelli (12) insgesamt 3mal mit 5 % TCA, danach mit Äthanol / Äther, dann mit Äther gewaschen und getrocknet. An tRNA gebundene ^3H -Aminosäure bleibt dabei auf dem Filter, während nichtgebundene ^3H -Aminosäure entfernt wird. Die Filter wurden in Szintillationsfläschchen gebracht und nach Zugabe von 100 μ l 0,1 n NaOH und 100 μ l 60 %iger Perchlorsäure mit

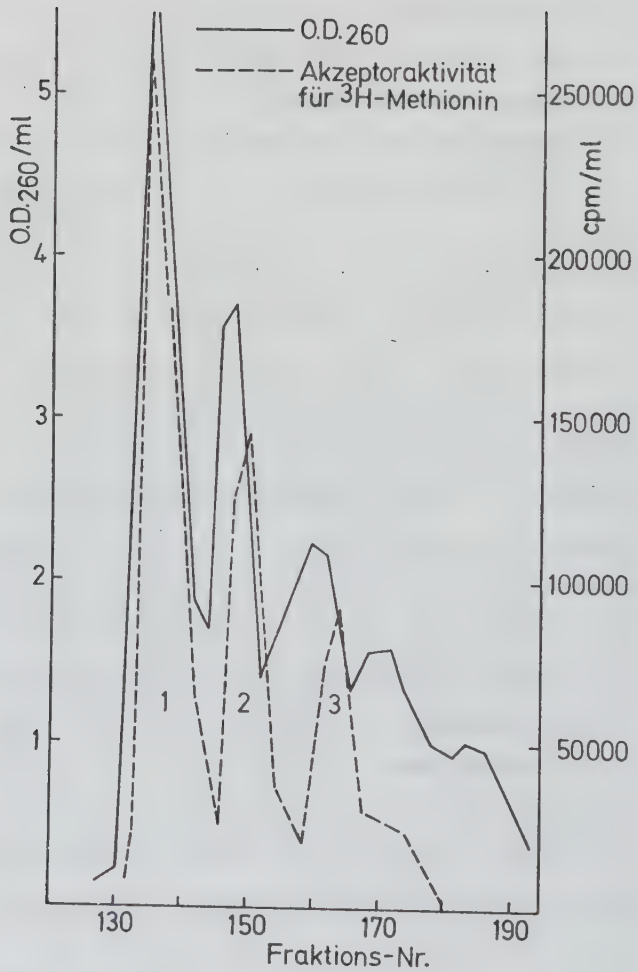


Abb. 5: Chromatographie der methionin-spezifischen tRNA-Fractionen aus Abb. 4 an BD-Zellulose.

15 ml Szintillationsflüssigkeit (Toluol: 1000 ml; Cellosolve: 500 ml; PPO: 6g) geschüttelt (13). Die anschließend gemessene Radioaktivität ist der Bindung von ^3H -Aminosäure an die spezifische, entsprechende tRNA proportional (Abb. 4, 5, 6). Die jeweils interessierenden Fraktionen (Fr. 75 - 88 für tRNA^{Met} und Fr. 118 - 129 für $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$) wurden getrennt vereinigt. Durch Zugabe von 0,1 Vol. 20 % Na-Acetat pH 5,0 und 2,5 Vol. Äthanol wurde die tRNA ausgefällt und konnte abzentrifugiert und im Exsikkator getrocknet werden.

b) Chromatographie an benzoylierter DEAE-Zellulose (BD-Zellulose):

Die tRNA^{Met} (990 O.D.₂₆₀-Einheiten, ca. 50 mg) aus den vereinigten und gefällten Fraktionen (Fr. 75 - 88, Abb. 4) wurde in einigen ml 0,02 m Tris·HCl pH 7,5 gelöst und auf eine BD-Zellulosesäule gebracht (Säulendimensionen: 64 cm lang; 2,5 cm $\varnothing$). Die Elution der drei tRNA^{Met} -Spezies (Abb. 5) erfolgte nach I. Gillam et al. (10) durch einen Natriumchlorid-Gradienten (0,4 m NaCl, 0,01 m MgCl_2 - 0,8 m NaCl, 0,01 m MgCl_2 , Gradientenvolumen 1200 ml). Es wurden Fraktionen zu je 10 ml gesammelt und darin die Akzeptoraktivität für ^3H -Methionin wie vorher beschrieben bestimmt. Die Fraktionen 134 - 140 (Abb. 5) enthielten reine $\text{tRNA}_1^{\text{fMet}}$ (327 O.D.₂₆₀-Einheiten),

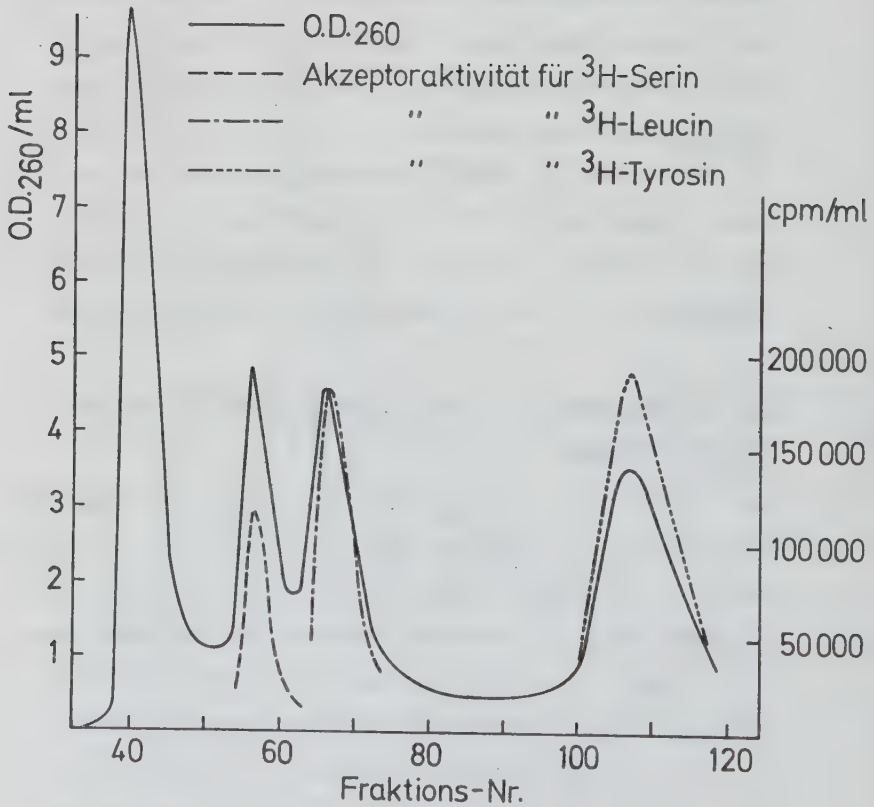


Abb. 6: Chromatographie der tyrosinspezifischen tRNA
(Hauptfraktion, tRNA₂^{Tyr}, Abb. 4) an BD-Zellulose.

die Fraktionen 149 - 153 enthielten $\text{tRNA}_2^{\text{Met}}$ (129 O.D.₂₆₀-Einheiten), die Fraktionen 162 - 166 enthielten $\text{tRNA}_3^{\text{Met}}$ (70 O.D.₂₆₀-Einheiten).

$\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$ (Fr. 118 - 129, 1970 O.D.₂₆₀-Einheiten, ca. 100 mg, Abb. 4) wurde wie soeben für tRNA^{Met} beschrieben an BD-Zellulose chromatographiert (Säulendimensionen: 63 x 1,4 cm). Nach Elution mittels eines linearen Gradienten (Gradientenvol. 600 ml) von 0,4 M NaCl (0,01 M MgCl_2) nach 1 M NaCl (0,01 M MgCl_2), wodurch serin- und leucinspezifische tRNAs eluiert wurden, konnte $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$ rein erhalten werden durch Elution mit einem anschließenden Äthanolgradienten (1 M NaCl, 0,01 M $\text{MgCl}_2 \rightarrow$ 1 M NaCl, 0,01 M MgCl_2 , 20 % Äthanol). Es wurden 25 mg = 500 O.D.₂₆₀-Einheiten $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$ erhalten (Abb. 6).

Isolierung eines bihelikalen Oligonukleotids aus $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$.

Nach RNase T_1 -Spaltungen ist ein bihelikales Oligonukleotid, bestehend aus dem 5'-terminalen Heptanukleotid und dem 3'-terminalen Nonadekanukleotid (Abb. 7A) in wechselnden Ausbeuten isoliert worden (14). Um Bedingungen zu finden, die eine Isolierung dieses Fragments in möglichst hoher Ausbeute erlauben, wurden in verschiedenen Versuchen jeweils 4 O.D.₂₆₀-Einheiten (200 μg) $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$ mit RNase T_1 gespalten, wobei die Temperatur, die Mg^{++} -Konzentration und die RNase T_1 -Konzentration variiert wurden. Das jeweils resultierende Hydrolysat wurde durch

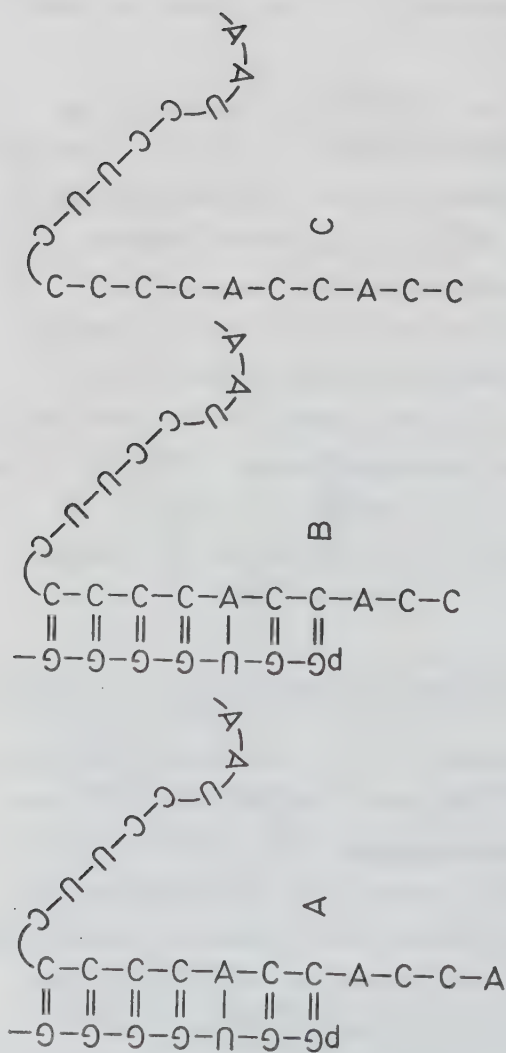


Abb. 7: Fragmente aus tRNA^{Tyr}₂ (Abb. 2);

A: bihelikales Oligonukleotid aus tRNA^{Tyr}₂;

B: bihelikales Oligonukleotid aus $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}_{\text{pCpC}}$;

C: 3'-terminales Oktadekanukleotid aus tRNA^{Tyr}_{pCpC}.

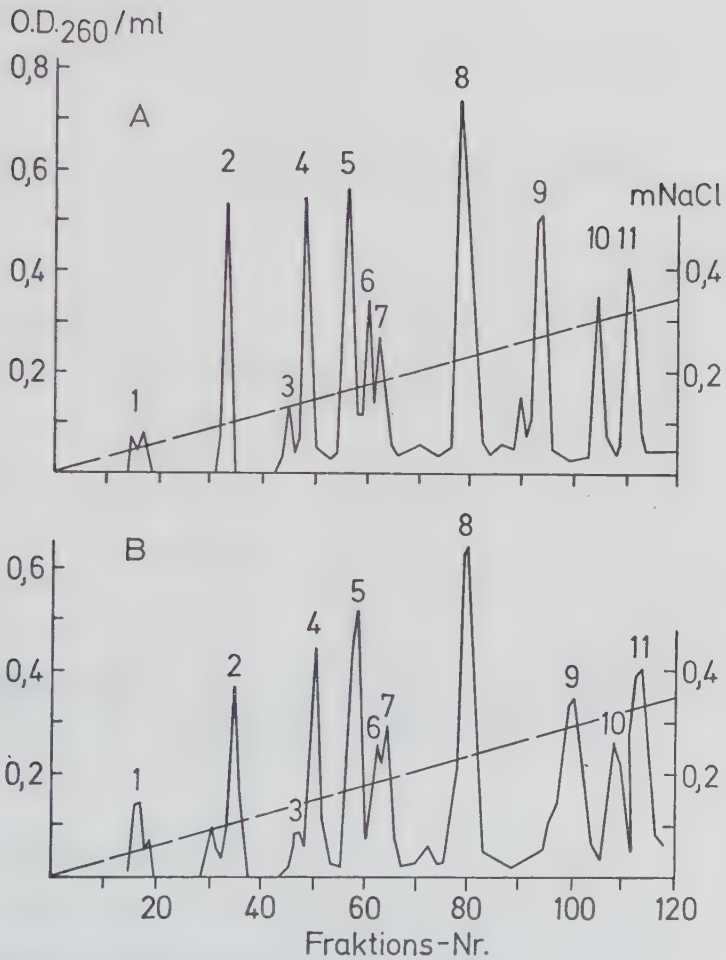


Abb. 8: Spaltung von tRNA^{Tyr}₂ (A) und tRNA^{Tyr}_{pCpC} (B) mit RNase T₁ und Trennung der Fragmente durch DEAE-Zellulose-Chromatographie in 7 m Harnstoff.

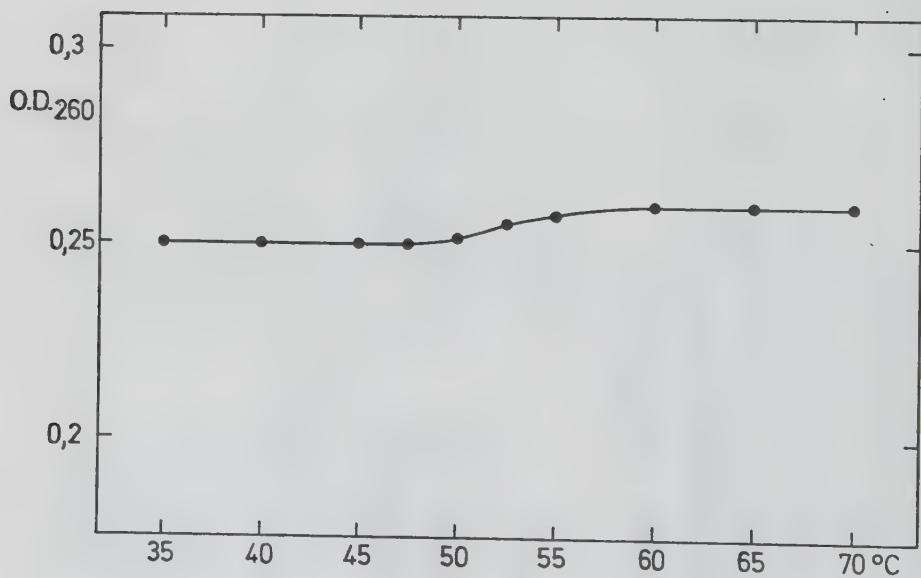


Abb. 9: Bestimmung des Schmelzpunktes des bihelikalen Oligonukleotids aus Abb. 7A.

Chromatographie in die Fragmente aufgetrennt. Das Ergebnis dieser Versuche ist die Isolierung von 3,4 O.D.₂₆₀-Einheiten des bihelikalen Oligonukleotids aus 34 O.D.-Einheiten tRNA₂^{Tyr}:

34 O.D.₂₆₀-Einheiten tRNA₂^{Tyr} wurden mit 25 Einheiten RNase T₁ (s.u.) in 300 µl Puffer (0,001 MgCl₂ - 0,05 m Tris·HCl pH 7,5) 5 Stunden bei 35° C inkubiert. Das Hydrolysat wurde durch Zugabe von festem Harnstoff 7 molar gemacht. Dieses Material wurde an DEAE-Zellulose in 7 m Harnstoff (Säulendimensionen 0,5 x 80 cm) unter Anwendung eines linearen NaCl-Gradienten (300 ml 0,02 m Tris·HCl pH 7,5 - 0,4 m NaCl in 0,02 m Tris·HCl pH 7,5, 300 ml) chromatographisch aufgetrennt (Abb. 8A). Peak 10 (das 3'-terminale Nonadekanukleotid) und Peak 11 (das bihelikale Oligonukleotid, Abb. 7A) wurden gesammelt und durch Chromatographie an einer 80 x 2 cm Bio-Gel P-2-Säule von Salz und Harnstoff befreit und im Vakuum bei Raumtemperatur am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt.

Strukturbeweis für das bihelikale Oligonukleotid:

Da dieses Oligonukleotid bereits einmal beschrieben worden war (14) und die Sequenz von tRNA₂^{Tyr} bekannt ist (14, 15), bestand der Strukturbeweis lediglich darin zu zeigen, daß es einige der beschriebenen Eigenschaften besitzt.

a) "Schmelzpunkt": Das Material aus Peak 11 wurde in 7 m Harnstoff langsam von Raumtemperatur bis auf 85° C erhitzt; dabei wurde gleichzeitig die optische Dichte bei 260 μ registriert (Abb. 9). Dabei wurde im Temperaturbereich von 50 bis 55° C ein Anstieg der optischen Dichte beobachtet, dessen Wendepunkt bei ca. 52° C lag.

b) Der "Schmelzpunkt" des Materials wurde mit der Methode differenzieller Schmelzpunktmessung bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Während der "Schmelzpunkt" von tRNA von der Konzentration unabhängig ist, da es sich um eine monomolekulare Reaktion handelt, wurde im vorliegenden Fall wie zu erwarten eine Konzentrationsabhängigkeit des "Schmelzpunktes" gefunden, da hier eine bimolekulare Reaktion vorliegt. (Diese Versuche wurden von Dr. Riesner et al. am Institut der Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung, Stöckheim, durchgeführt).

c) Die beiden Komponenten des bihelikalen Oligonukleotids, das 5'-terminale Heptanukleotid und das 3'-terminale Nonadekanukleotid, konnten nach RajBhandary et al. (14) an einer auf 63° C aufgeheizten DEAE-Zellulosesäule in 7 m Harnstoff mittels eines linearen NaCl-Gradienten von $\text{O} \rightarrow 0,4 \text{ m NaCl}$ voneinander getrennt werden.

Darstellung des entsprechenden bihelikalen Oligonukleotids ohne das 3'-terminale 5'-AMP (Abb. 7B):

a) Darstellung von tRNA^{Tyr}_{pCpC} (16):

4 mg (80 O.D.₂₆₀) reiner tRNA^{Tyr}₂ wurden in 2 ml 0,1 m NaAc pH 5,0 mit 1 mg NaJO₄ und 30 µl Cyclohexylamin 60 min bei 45° C inkubiert. Danach wurde die tRNA durch Zugabe von 0,1 Vol. 20 % NaAc pH 5,0 und 2 Vol. Äthanol ausgefällt und abzentrifugiert (tRNA^{Tyr}_{pCpC}).

Zur Abspaltung des 3'-terminalen Phosphatrestes wurde die tRNA^{Tyr}_{pCpC} in 1 ml 0,05 m Tris·HCl pH 8,0 mit 1 mg alkalischer Phosphatase (s.u.) aus E.coli 60 min bei 45° C inkubiert. Danach wurde die Phosphatase durch zweimaliges Phenolisieren abgetrennt und die tRNA^{Tyr}_{pCpC} wurde durch Zugabe von 0,1 Vol. 20 % NaAc pH 5,0 und 2 Vol. Äthanol ausgefällt und abzentrifugiert. Die Ausbeute an tRNA^{Tyr}_{pCpC} betrug 58 O.D.₂₆₀-Einheiten (72 % der Theorie).

b) Spaltung von tRNA^{Tyr}_{pCpC} mit RNase T₁:

50 O.D.₂₆₀-Einheiten tRNA^{Tyr}_{pCpC} wurden mit 35 Einheiten RNase T₁ in 800 µl 0,05 m Tris·HCl pH 7,5 - 0,001 m MgCl₂ 4 1/2 Stdn. bei 30° inkubiert. Das Hydrolysat wurde mit Harnstoff 7 molar gemacht und an einer

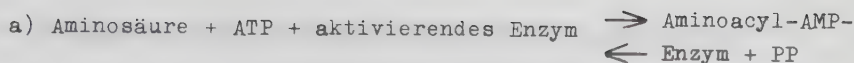
DEAE-Zellulosesäule (0,5 x 75 cm) in 7 m Harnstoff chromatographiert (Gradientenvolumen: 600 ml 0,02 m Tris·HCl pH 7,5 - 7 m Harnstoff, linearer NaCl-Gradient von 0 bis 0,4 m NaCl). Peak 11 (Abb. 8B), das bihelikale Oligonukleotid ohne 3'-terminales AMP wurde durch Chromatographie an einer 80 x 2 cm Bio-Gel P-2-Säule von Salz und Harnstoff befreit und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Mit Peak 10, dem 3'-terminalen Oktadekanukleotid (Abb. 7C), wurde ebenso verfahren.

E n z y m e :

Alkalische Phosphatase aus E.coli (Boehringer Mannheim GmbH) wurde zur Abspaltung endständiger Phosphatgruppen an RNA verwendet.

Ribonuklease T₁ (RNase T₁ Boehringer) spaltet Ribonukleinsäuren an der 3'-Seite von Guanylsäure unter Bildung von 3'-GMP oder der entsprechenden Oligonukleotide.

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen katalysieren die Veresterung von Aminosäuren mit den entsprechenden tRNAs. Zuerst wird ein Komplex aus Enzym, Aminosäure und AMP gebildet, aus dem dann die Aminosäure an eine für sie spezifische tRNA angelagert wird.



Diese Enzyme wurden aus E.coli MRE 600 bei +4° C präpariert (17): 38 g gefrorene E.coli wurden mit Aluminiumoxid zermalen und mit 150 ml Puffer B (Tris·HCl pH 7,6:0,05⁷m - MgAc₂:0,01 m - KCl:0,04 m - EDTA:0,001 m - Mercapto-äthanol:0,005 m) versetzt. Das Aluminiumoxid und die Zellfragmente wurden durch 25 min Zentrifugation bei 18.000 Upm, die Ribosomen durch 1 1/2 Stdn. Ultrazentrifugation bei 40.000 Upm abgetrennt. Die Sedimente wurden verworfen und der letzte Überstand wurde mit NaCl 0,25 molar gemacht. Es wurden 20 g DEAE-Zellulose (Nassgewicht) hinzugefügt und die Suspension nach 10 min gefiltert. Das Filtrat wurde zu 40 % mit Ammoniumsulfat gesättigt, das Präzipitat durch Zentrifugation abgetrennt und verworfen. Der Überstand wurde mit Ammoniumsulfat zu 70 % gesättigt, das Präzipitat durch Zentrifugation gesammelt und - in 10 ml Puffer B gelöst - auf eine Bio-Gel P-4-Säule (S.D. 30 cm x 1,5 cm) aufgetragen. Der erste Peak, der eluiert wurde, enthielt die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen. Diese Fraktionen wurden gesammelt, mit vorgekühltem Glycerin im Verhältnis 1 : 1 versetzt und bei -20° C aufbewahrt. Diese Präparation war

frei von Nukleasen und CCA-Enzym. Die Enzymaktivität blieb über ein Jahr lang erhalten.

Poly A-Polymerase und CCA-Enzym wurden nach der Vorschrift von Gross und Alberty (2) durch Chromatographie eines ribosomen-freien E.coli-Extraktes an DEAE-Zellulose voneinander getrennt und partiell gereinigt.

Sucrosegradientenzentrifugation zur Bestimmung des Molekulargewichts von Poly A-Polymerase: Zentrifugenbecher von 4,5 ml Inhalt wurden mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 20 % Sucrose in 1 m Tris·HCl pH 8,4 gefüllt. Auf diesen Gradienten wurden vorsichtig 100 μ l (= 50 μ g Protein) einer partiell gereinigten Poly A-Polymerase aufgeschichtet. Auf weitere Zentrifugenbecher mit demselben Sucrosegradienten wurden Lösungen verschiedener Proteine mit bekanntem Molekulargewicht aufgeschichtet:

Myoglobin vom Pferd (MG 17.800), Chymotrypsinogen A (MG 25.000), Albumin aus Hühnerei (MG 45.000) und Albumin aus Rinder Serum (MG 67.000, alle von SERVA). Nach 20 Stdn. Ultrazentrifugation bei 55.000 Upm im Rotor SW 60 (Omega II Christ) wurden die Zentrifugenröhrchen von unten mit einer Kanüle durchstoßen und der Inhalt durch Austropfen auf 32 Fraktionen verteilt (Abb. 10A). Die Lokalisation der Poly A-Polymerase erfolgte durch Inkubation der Fraktionen mit 14 C-ATP und tRNA (2); gemessen wurde der Einbau von 14 C-AMP in tRNA. Die Lokalisation des Molekulargewichts-

standards erfolgte mittels der Biuret-Reaktion auf Proteine (18). Das Ergebnis der Versuche zeigt Abb. 10B (MG ca. 40.000).

Komplexbildung von Poly A-Polymerase mit tRNA:

a) Eine Mischung von partiell gereinigter Poly A-Polymerase (50 μ g) und überschüssiger tRNA (200 μ g) in 100 μ l wurde wie vorher auf einen Sucrosegradienten aufgeschichtet und ebenso zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Material durch Aufstechen des Zentrifugenröhrchens und Austropfen auf 32 Fraktionen verteilt, in denen wie zuvor die Enzymaktivität bestimmt wurde (Abb. 10C). Es ist klar erkennbar, daß das Enzym nun ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 80.000 hat, d.h. es sedimentierte in einem stabilen Komplex mit tRNA.

b) Ein weiterer Versuch wurde durchgeführt, jedoch mit dem Unterschied, daß der gesamte Sucrosegradient tRNA (200 μ g/ml) enthielt. In diesem Fall sedimentierte die Poly A-Polymerase mit einem scheinbar nochmals erhöhten Molekulargewicht. Damit ist die Existenz eines Komplexes aus 1 Molekül Enzym und 2 oder mehr Molekülen tRNA nachgewiesen worden (Abb. 10D). Dieser Komplex ist labil, da er nur beobachtet wurde, wenn der gesamte Gradient tRNA enthielt und somit das Enzym bei seiner Wanderung

im Schwerfeld ständig im Gleichgewicht mit tRNA war. Wäre der Komplex stabil, dann hätte er auch im Versuch zu Abb. 10C beobachtet werden müssen.

Versuche zum AMP-Einbau in tRNA und tRNA-Fragmente durch die beiden Nukleotidyltransferasen tRNAadenylyl- (cytidyl)transferase (CCA-Enzym) und Poly A-Polymerase

1. tRNA: a) tRNA₂^{Tyr} (Abb. 2) -

b) tRNA_{pCpC}^{Tyr}

2. tRNA-Fragmente:

a) das 3'-terminale Oktadekanukleotid aus tRNA_{pCpC}^{Tyr} (RNase T₁-Spaltung, Peak 10 (Abb. 8B)

AAUCCUUGCCCCACCACC (Abb. 7C)

b) das bihelikale Oligonukleotid aus tRNA_{pCpC}^{Tyr} (RNase T₁-Spaltung, Peak 11, (Abb. 8B)

AAUCCUUGCCCCACCACC (3')

""""""""

pGGGGGUGGp (5')

(Abb. 7B)

Der Inkubationsansatz zum Test auf CCA-Enzym- und Poly A-Polymerase-aktivität enthielt in 200 µl:

Tris·HCl pH 8,4 : 10 µM - MgCl₂ : 1,6 µM - Mercaptoäthanol : 0,4 µM (für CCA-Enzym zusätzlich : CTP : 10 nM)

- Phosphoenolpyruvat : 130 µg - Phosphoenolpyruvat - Kinase :

2,5 µg - ¹⁴C - ATP (spez. Aktivität 0,5 ci/Mol) : 33 nM -

tRNA₂^{Tyr}, tRNA_{pCpC}^{Tyr} oder tRNA-Fragmente wie oben beschrieben :

5 nM - und eine der beiden partiell gereinigten Enzymfraktionen (s. oben) : 40 μ g Protein. Das Phosphoenolpyruvat und die Phosphoenolpyruvat-Kinase in diesem Test dienen als ATP-regenerierendes System.

Es wurde bei 37⁰ inkubiert; nach 10, 20, 30, 60, 90, 120 und 150 min wurden Aliquote von je 20 μ l entnommen und auf 2,4 cm-Rundfilter aufgebracht. Die enzymkatalysierte Bindung von ¹⁴C-AMP an tRNA oder tRNA-Fragmente wurde nach Mans und Novelli bestimmt (12): die Rundfilter wurden dreimal mit eiskalter 5 %iger TCA, dann mit Äther / Äthanol und schließlich mit Äther gewaschen. Durch diese Prozedur wird lösliches, nicht an tRNA oder tRNA-Fragmente gebundenes ¹⁴C-ATP von den Filtern entfernt, während gebundenes ¹⁴C-AMP zusammen mit der tRNA oder den tRNA-Fragmenten unlöslich auf den Filtern zurückbleibt. Die an die Filter gebundene Radioaktivität wurde mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit im Packard Tri-carb Modell 3380 gemessen.

D. Ergebnisse und Diskussion

Transfer-Ribonukleinsäuren spielen eine zentrale Rolle bei der Proteinbiosynthese in vivo und in vitro. Es gibt für jede der 20 Aminosäuren eine oder mehrere ("iso-akzeptierende") tRNAs, und für jede Aminosäure gibt es jeweils nur ein zugeordnetes Enzym (die sog. Aminoacyl-tRNA-Synthetase), welches unter Verbrauch von ATP diese eine Aminosäure aktiviert und auf die zugehörige, richtige tRNA überträgt. Der Mechanismus der Erkennung der "richtigen" Aminosäure und der "richtigen" tRNA durch die Synthetase ist noch weitgehend unbekannt. - Die mit der zugehörigen Aminosäure beladene tRNA tritt bei der Proteinbiosynthese an der Ribosomenoberfläche durch Codon-Anticodonwechselwirkung mit der messenger-RNA in Kontakt und gibt die aktivierte Aminosäure an die wachsende Peptidkette ab. Von diesen beiden Funktionen der tRNA bei der Proteinbiosynthese,

- a) Aktivierung der Aminosäure durch Veresterung ihrer Carboxylgruppe mit der 3'-Hydroxylgruppe des 3'-terminalen Adenosins und
- b) Abgabe der aktivierten Aminosäure von der tRNA auf die wachsende Peptidkette

ist nur der erstgenannte Prozess geeignet, als einfacher Test für eine bestimmte tRNA zu dienen. Die enzymkataly-

sierte Beladung einer tRNA mit der zugehörigen radioaktiv markierten Aminosäure ist der bequemste Weg zur quantitativen und qualitativen Bestimmung einer tRNA. Durch die enzymatische Übertragung der radioaktiven Aminosäure auf tRNA wird nämlich die Radioaktivität unlöslich in 5 %iger Trichloressigsäure und kann dadurch abgetrennt und gemessen werden (11, 12). Dieses einfache Verfahren wurde bei der Isolierung reiner tRNA-Spezies durch Säulenchromatographie eingesetzt. Die Chromatographie von unfractionierter E.coli-tRNA an DEAE-Sephadex A-50, die nach Nishimura (9) durchgeführt wurde, ergab eine Anreicherung verschiedener tRNA-Spezies, insbesondere von tRNA^{Met} und tRNA₂^{Tyr} (Abb. 4). Die Chromatographie dieser tRNA^{Met}-Fraktionen an BD-Zellulose mittels eines Kochsalzgradienten (Abb. 5) und der tRNA₂^{Tyr}-Fraktionen, ebenfalls an BD-Zellulose, jedoch mit einem Äthanolgradienten (Abb. 6) lieferte reine tRNA₁^{fMet}, tRNA₂^{Met}, tRNA₃^{Met}, bzw. tRNA₂^{Tyr}. (Die Chromatographie an BD-Zellulose wurde analog einer Vorschrift von Gillam et al. (10) durchgeführt, die zunächst für die Fraktionierung von HefetRNAs entwickelt worden war).

Eines der Kriterien für die Reinheit einer spezifischen tRNA ist das Spaltmuster mit Ribonuklease T₁. Dieses Enzym spaltet RNA auf der 3'-Seite von GMP, es entstehen also Fragmente verschiedener Kettenlänge, die

alle auf Gp enden. Bei der Chromatographie an DEAE-Zellulose mittels eines NaCl-Gradienten in Gegenwart von 7 molar Harnstoff werden diese Fragmente nach ihrer Kettenlänge derart getrennt, daß zunächst 3'-GMP (Gp), dann Dinukleotide, Trinukleotide usw. nacheinander eluiert werden. Abb. 8A zeigt ein so erhaltenes Spaltmuster von $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$. Das Spaltmuster ist einfach und enthält keine Spaltstücke, welche mit der bekannten Nukleotidsequenz von $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$ (Abb. 2) unvereinbar sind; diese tRNA ist also rein.

Für die Problemstellung dieser Arbeit war das bihelikale Oligonukleotid (Abb. 8A, 8B, Peak 11) von besonderem Interesse, da es einen wichtigen Strukturbereich dieser tRNA darstellt, nämlich den Aminosäure-Akzeptor-Stamm und damit zugleich mit dem 3'-CCA-Terminus den Angriffsort der tRNAadenylyl(cytidylyl)transferase (Abb. 2).

Es war zunächst nötig, die Ausbeute an diesem Fragment zu erhöhen. Ein Blick auf die Strukturformel dieses Fragments zeigt, daß es im 5'-terminalen Heptanukleotid sechs Guanylsäurereste enthält und daher das Produkt einer unvollständigen Spaltung ist. Es galt also, durch Variation der RNase T_1 -Spaltung Bedingungen zu finden, die eine Isolierung von mehr bihelikalem Oligonukleotid erlauben bei sonst gleichbleibender Spaltung des tRNA-Moleküls. Das wurde schließlich erreicht durch Erniedrigung der Inkubationstemperatur

von 37 auf 30° C, Zugabe von $MgCl_2$ (0,001 m), sowie durch geringfügige Herabsetzung der RNase T_1 -Konzentration und der Inkubationszeit (Abb. 8A). Es galt nun, von $tRNA_2^{Tyr}$ das 3'-terminale AMP abzuspalten (" $tRNA_{pCpC}^{Tyr}$ "), um danach aus dieser tRNA nach dem soeben beschriebenen Verfahren das bihelikale Oligonukleotid mit fehlendem 3'-AMP darzustellen (Abb. 7B). Dies gelang durch Oxydation von $tRNA_2^{Tyr}$ mit Perjodat (Oxydation des 3'-terminalen Ribosereses zum Dialdehyd und Cyclohexylaminbehandlung) (16), wodurch das 3'-terminale Adenosin abgespalten wird. Die resultierende $tRNA_{pCpC}^{Tyr}$ wurde mit alkalischer Bakterienphosphatase behandelt zur Abspaltung des 3'-terminalen Phosphatrestes. Diese $tRNA_{pCpC}^{Tyr}$ wurde in Gegenwart von $MgCl_2$ wie vorher beschrieben mit RNase T_1 gespalten (Abb. 8B). Das entsprechende bihelikale Oligonukleotid (Peak 11) wurde in guter Ausbeute erhalten.

Mit der Reinigung und Isolierung reiner $tRNA_2^{Tyr}$, $tRNA_{pCpC}^{Tyr}$ sowie eines doppelsträngigen und eines einsträngigen $tRNA_2^{Tyr}$ -Fragments (Abb. 7C) war ein Teil der gestellten Aufgabe gelöst, nämlich die Präparation geeigneter Substrate für die beiden zu untersuchenden Enzyme tRNAadenylyl(cytidylyl)transferase und Poly A-Polymerase.

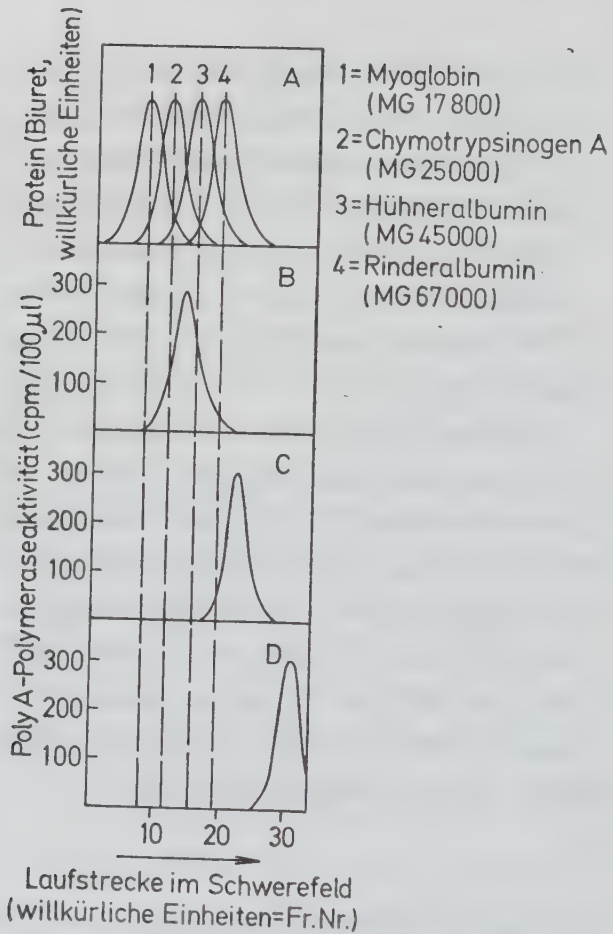


Abb. 10: Sucrosegradientenzentrifugation von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht (A) sowie von Poly A-Polymerase (B).
 C: Zentrifugation von Poly A-Polymerase zusammen mit tRNA;
 D: Zentrifugation von Poly A-Polymerase in einem tRNA-haltigen Sucrosegradienten.

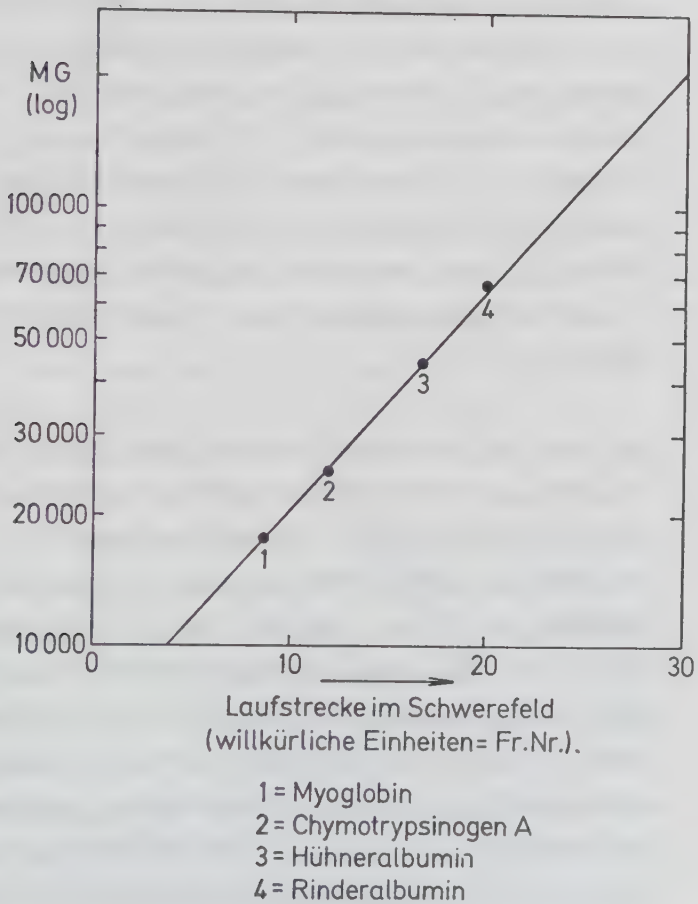


Abb. 11: Eichkurve für die Sucrosegradienten-
zentrifugation mittels Molekular-
gewichtsstandards.

Die beiden Enzyme wurden durch Chromatographie des ribosomenfreien Zellsaftes von E.coli an DEAE-Zellulose voneinander getrennt und partiell gereinigt; diese Trennung war zu Beginn dieser Arbeit entwickelt worden (2). Das recht gut bekannte CCA-Enzym (3, 4, 19) bewirkt in Gegenwart von Pyrophosphat die Abspaltung der 3'-terminalen CCA-Sequenz, wobei CTP und ATP entstehen, während es unter geeigneten Bedingungen die Umkehrung dieser Reaktion katalysiert (s. "Problemstellung" und Abb. 3).

Die Poly A-Polymerase katalysiert in vitro die Addition von $(AMP)_n$ an das 3'-Ende von tRNA, wobei tRNA mit einer 3'-terminalen Poly A-Sequenz entsteht (2).

Die Funktion dieses Enzyms in vivo ist noch völlig unbekannt und es galt zunächst, das Enzym zu charakterisieren. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde die Methode der Sucrosegradientenzentrifugation angewandt. In den Röhrchen eines Schwingbecherrotors wurde mittels eines geeigneten Gradientenmischgerätes ein linearer Sucrosegradient erzeugt. Auf verschiedene Gradienten wurden Proteine von bekanntem Molekulargewicht aufgeschichtet, eines der Röhrchen enthielt die Poly A-Polymerase von unbekanntem Molekulargewicht. Nach der Ultrazentrifugation waren die Proteine je nach Molekular-

gewicht in Richtung der Schwerkraft gewandert. Die Proteine von bekanntem Molekulargewicht erlaubten die Aufstellung einer Eichkurve, die eine Gerade ist, da unter den gegebenen Bedingungen die Wanderungsstrecke der Proteine proportional dem Logarithmus des Molekulargewichts ist (Abb. 11). Für Poly A-Polymerase ergab sich hierbei ein Molekulargewicht von 40.000 (Abb. 10B), also dasselbe wie für das CCA-Enzym (19). Da für das CCA-Enzym eine Komplexbildung mit tRNA durch Sucrosegradientenzentrifugation nachgewiesen worden war (20), sollte geprüft werden, ob sich Poly A-Polymerase ähnlich verhält. Wenn dieses Enzym mit überschüssiger tRNA vermischt der Sucrosezentrifugation unterworfen wurde, ergab sich tatsächlich für das Enzym ein um ca. 30 - 40.000 erhöhtes Molekulargewicht, womit ein stabiler 1 : 1-Komplex zwischen tRNA und Poly A-Polymerase erwiesen war (Abb. 10C). Schließlich konnte noch ein instabiler Komplex nachgewiesen werden: enthielt der gesamte Sucrosegradient eine geringe Menge tRNA, so daß das Enzym auf seiner Wanderung im Schwerfeld in ständigem Kontakt mit tRNA war, so wurde eine weitere Erhöhung des Molekulargewichts gefunden (Abb. 10D). Dies kann nur erklärt werden durch Bildung eines instabilen Komplexes aus einem Molekül Poly A-Polymerase und zwei oder mehr Molekülen tRNA.

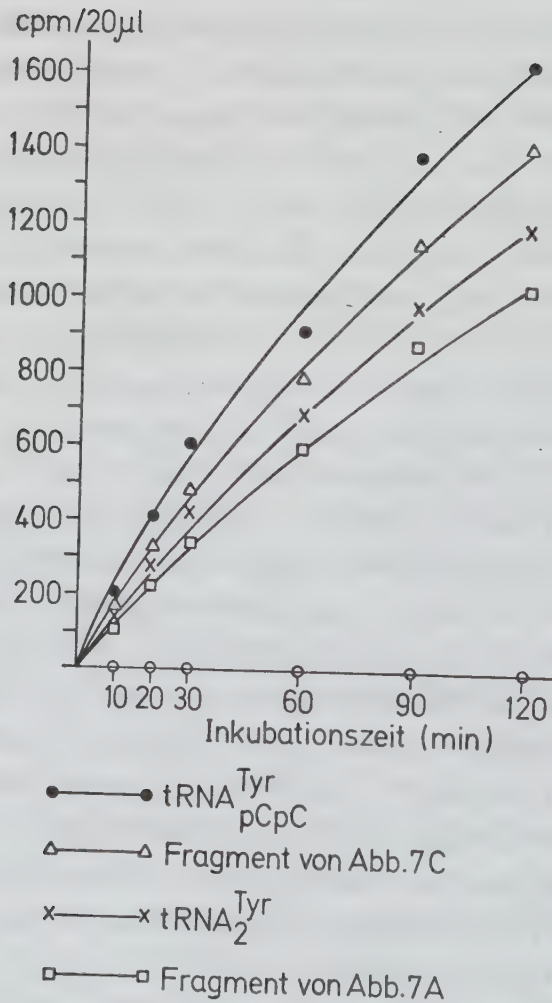


Abb. 12: Einbau von ¹⁴C-AMP in tRNA und tRNA-Fragmente (Poly A-Polymerase).

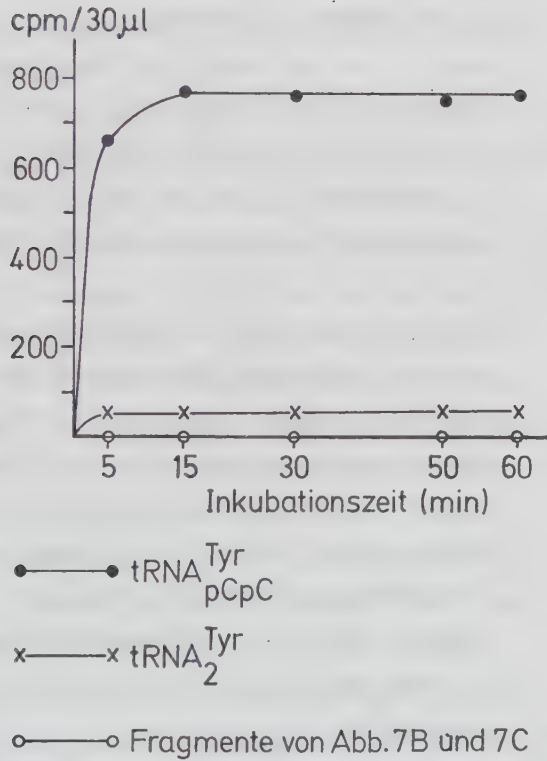


Abb 13: Einbau von ^{14}C -AMP in tRNA und tRNA-Fragmente (CCA-Enzym).

Mit dem vorhandenen Material - tRNAs und tRNA-Fragmente, CCA-Enzym und Poly A-Polymerase - war es nun möglich, folgende Fragen zu beantworten:

1. Kann Poly A-Polymerase als Starter für die Poly A-Synthese außer $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$ auch $\text{tRNA}_{\text{pCpC}}^{\text{Tyr}}$, das bihelikale Oligonukleotid (Abb. 7A) und vielleicht gar das 3'-terminale Nonadekanukleotid benutzen?
2. Das CCA-Enzym kann in intakte tRNA kein AMP einbauen, da die 3'-terminale CCA-Sequenz bereits vorhanden ist (Abb. 2), dagegen repariert es $\text{tRNA}_{\text{pCpC}}$ durch Einbau eines Adenylsäurerestes (Abb. 3). Würde das CCA-Enzym diese Reparatur-Reaktion auch an dem aus $\text{tRNA}_{\text{pCpC}}^{\text{Tyr}}$ hergestellten bihelikalen Oligonukleotid, welches das 3'-terminale AMP verloren hat (Abb. 7B) durchführen können? Würde das CCA-Enzym möglicherweise auch das 3'-terminale Oktadekanukleotid aus $\text{tRNA}_{\text{pCpC}}^{\text{Tyr}}$ (Abb. 7C) reparieren?

Das Ergebnis der diesbezüglichen Versuche ist in Abb. 12 und Abb. 13 dargestellt und ist zusammengefaßt folgendes:

1. Poly A-Polymerase (Abb. 12) kann sowohl tRNA (E.coli, unfractioniert), $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$, $\text{tRNA}_{\text{pCpC}}^{\text{Tyr}}$, das bihelikale Oligonukleotid als auch das 3'-terminale Nonadekanukleotid als Starter für die Synthese von Poly A benutzen. Da inzwischen auch gefunden worden ist, daß dieses Enzym auch hochmolekulare ribosomale RNA benutzen kann (H. J. Gross, unveröffentlicht) bedeutet dies, daß die Poly A-Polymerase anscheinend RNA jeder beliebigen Struktur und Kettenlänge (vom Molekulargewicht 6000 bis 1 Million) als Starter für die Poly A-Synthese benutzen kann. Da in der E.coli-Zelle bisher keine an tRNA oder ribosomale RNA gebundenen Poly A-Sequenzen gefunden worden sind, bleibt die Frage offen, wozu das Enzym in vivo gebraucht wird. Sein Vorhandensein läßt darauf schließen, daß es eine noch unbekannte Funktion ausübt. Die von Gross und Alberty (2) gezeigte dreifache Steigerung der Aktivität dieses Enzyms nach Infektion von E.coli-Zellen mit dem Bakteriophagen T_4 erlaubt den Schluß, daß die Poly A-Polymerase eine noch unbekannte Bedeutung für die Vermehrung des Bakteriophagen haben könnte.
2. Das CCA-Enzym (Abb. 13) kann an $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$ kein AMP anhängen, da die 3'-terminale CCA-Sequenz intakt ist.

$\text{tRNA}_{\text{pCpC}}^{\text{Tyr}}$ dagegen wird durch Anhängen eines AMP-Restes repariert. Dieser Befund ist nicht neu, er ist im Zusammenhang dieser Arbeit jedoch insofern wichtig, als er zeigt, daß das verwendete CCA-Enzym genau die Eigenschaften hat, die aus der Literatur bekannt sind (3, 4, 19). Dagegen war bisher nicht bekannt, ob das Enzym mit so kleinen tRNA-Fragmenten wie dem bihelikalen Oligonukleotid (Abb. 7B) oder dem Oktadekanukleotid (Abb. 7C) aus $\text{tRNA}_{\text{pCpC}}^{\text{Tyr}}$ reagieren würde. Der Versuch lieferte ein klares und eindeutiges Ergebnis:

beide tRNA-Fragmente sind kein Substrat für das CCA-Enzym. Dies bedeutet, daß die Regionen der tRNA, an denen das CCA-Enzym sein Substrat, die tRNA, erkennt, in den beiden Fragmenten fehlen. Das ergänzt die Befunde anderer Autoren, die gezeigt haben, daß das CCA-Enzym aus Hefe nur solche tRNA-Fragmente als Substrate erkennt, die wesentlich größer sind als die hier benutzten (21).

Tabelle 1 stellt noch einmal einige wichtige Eigenschaften der beiden Enzyme einander gegenüber. Die Enzyme sind einander recht ähnlich und können am einfachsten durch ihre Reaktion mit intakter tRNA (CCA-Enzym: keine Reaktion) oder tRNA-Fragmenten (CCA-Enzym: keine Reaktion) unterschieden werden. - Während das CCA-Enzym in vivo

dafür sorgt, daß tRNA, deren 3'-terminale CCA-Sequenz durch Nukleasen abgespalten worden ist, wieder repariert wird, bleibt die biologische Funktion der Poly A-Polymerase noch unbekannt.

T a b e l l e 1

	CCA-Enzym	Poly A-Polymerase
Molekulargewicht	~40.000	~40.000 *
Komplexbildung mit tRNA	ja	ja *
AMP-Einbau in tRNA	nein	ja, mehr als 1 Mol AMP pro Mol tRNA
AMP-Einbau in tRNA _{pCpC}	ja, 1 Mol AMP pro Mol tRNA	ja, mehr als 1 Mol AMP pro Mol tRNA
AMP-Einbau in tRNA-Fragmente	nein *	ja *

* Diese Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit erzielt

E. Zusammenfassung

1. Tyrosin-spezifische transfer-RNA ($\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$) aus E.coli wurde aus unfraktionierter E.coli-tRNA rein isoliert durch Chromatographie an DEAE-Sephadex und benzoylierter DEAE-Zellulose.
2. Aus reiner $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$ wurde durch RNase T_1 -Spaltung ein bihelikales Oligonukleotid isoliert, welches die "Stammregion" dieser tRNA darstellt. Die Bedingungen für eine bessere Ausbeute wurden untersucht und es wurde eine Vorschrift erarbeitet, welche die doppelte Ausbeute im Vergleich zu bisher liefert.
3. $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$ wurde durch Perjodatoxidation, Cyclohexylaminspaltung und Phosphatasebehandlung in $\text{tRNA}_{\text{pCpC}}^{\text{Tyr}}$ übergeführt, welche sich vom $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$ durch das fehlende 3'-terminale 5'-AMP unterscheidet. Diese tRNA ist ein natürliches Substrat des Enzyms tRNAadenylyl(cytidylyl)transferase.
4. Aus $\text{tRNA}_{\text{pCpC}}^{\text{Tyr}}$ gelang durch RNase T_1 -Spaltung die Isolierung eines entsprechenden bihelikalen Oligonukleotids mit fehlendem 3'-terminalen 5'-AMP.

5. Die beiden Nukleotidyltransferasen aus *E.coli* tRNAadenylyl(cytidylyl)transferase (CCA-Enzym) und Poly A-Polymerase wurden durch Chromatographie vollständig voneinander getrennt und partiell gereinigt.
6. Poly A-Polymerase wurde durch Sucrosegradientenzentrifugation untersucht. Es wurde ein Molekulargewicht von ca. 40.000 gefunden.
7. Ebenfalls durch Sucrosegradientenzentrifugation wurde die Komplexbildung von Poly A-Polymerase mit tRNA untersucht. Es wurde ein stabiler Komplex aus 1 Mol tRNA und 1 Mol Enzym sowie ein labiler Komplex aus 2 oder 3 Mol tRNA und 1 Mol Poly A-Polymerase nachgewiesen.
8. Die Reaktion von Poly A-Polymerase und tRNAadenylyl(cytidylyl)transferase (CCA-Enzym) mit $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$, $\text{tRNA}_{\text{pCpC}}^{\text{Tyr}}$ und tRNA^{Tyr}-Fragmenten wurde untersucht.
 - a) Poly A-Polymerase kann sowohl $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$, $\text{tRNA}_{\text{pCpC}}^{\text{Tyr}}$, das bihelikale Oligonukleotid aus $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$ als auch das 3'-terminale Nonadekanukleotid aus $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$ als Substrate (d.h. Starter für die Poly A-Synthese) benutzen.

- b) Es wurde gefunden, daß tRNA^{Tyr}adenylyl(cytidylyl)-transferase nur an tRNA^{Tyr}_{pCpC} ein 3'-terminales 5'-AMP anzuhängen in der Lage ist. tRNA^{Tyr}₂ mit intaktem 3'-Terminus ist kein Substrat für dieses Enzym, ebenso wenig wie das bihelikale Oligonukleotid, welches die "Stammregion" aus tRNA^{Tyr}_{pCpC} enthält. Damit ist gezeigt, daß die "Stammregion", zumindest von Tyrosin-tRNA, nicht die Erkennungsregion für tRNA^{Tyr}adenylyl(cytidylyl)-transferase enthält.

E. Summary

1. Pure tyrosine-specific transfer RNA ($\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$) from *E. coli* was isolated from unfractionated *E. coli* tRNA after chromatography on DEAE-sephadex and benzoylated DEAE-cellulose.
2. A bihelical oligonucleotide, containing the "stem region" of $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$ was isolated from a RNase T_1 digest of this tRNA. The conditions for a better yield were investigated and a procedure was developed which allowed to obtain twice the yield than hitherto possible.
3. Periodate oxidation, cyclohexylamine and phosphatase treatment of $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$ allowed the isolation of $\text{tRNA}_{\text{pCpC}}^{\text{Tyr}}$, which differs from $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$ only in its lack of the 3'-terminal 5'-AMP. This tRNA is a natural substrate of the enzyme tRNAadenylyl(cytidylyl)-transferase.
4. RNase T_1 digestion of $\text{tRNA}_2^{\text{Tyr}}$ allowed the isolation of a corresponding bihelical oligonucleotide lacking the 3'-terminal 5'-AMP.

5. Both nucleotidyl transferases from E.coli, tRNAadenylyl(cytidylyl)transferase (CCA-enzyme) and poly A-polymerase have been completely separated from each other and partially purified by means of chromatography.
6. Poly A-polymerase was investigated by sucrose gradient centrifugation, and a molecular weight of 40.000 was found.
7. Sucrose gradient centrifugation allowed to study complex formation of poly A-polymerase with tRNA. A stable 1 : 1 complex was found as well as a labile complex consisting of 2 to 3 molecules tRNA and 1 molecule of poly A-polymerase.
8. The reaction of poly A-polymerase and tRNAadenylyl(cytidylyl)transferase (CCA-enzyme) with tRNA₂^{Tyr}, tRNA_{pCpC}^{Tyr} and tRNA^{Tyr} fragments was studied.
 - a) Poly A-polymerase is able to use tRNA₂^{Tyr}, tRNA_{pCpC}^{Tyr}, the bihelical oligonucleotide as well as the 3'-terminal nonadekanucleotide from tRNA₂^{Tyr} as substrates (i.e. as primers for poly A-synthesis).

- b) tRNAadenylyl(cytidylyl)transferase attaches only a single 3'-terminal 5'-AMP to tRNA^{Tyr}_{pCpC}. tRNA^{Tyr}₂ with intact 3'-terminus is no substrate for this enzyme, nor is it the bihelical oligonucleotide which contains the "stem region" of tRNA^{Tyr}_{pCpC}. This demonstrates that the "stem region", at least of tyrosine-tRNA, does not contain the recognition site for tRNAadenylyl(cytidylyl)transferase.

F. Literatur

- 1.) V. Daniel, S. Sarid and U. Z. Littauer,
Science 167, 1682 (1970)
- 2.) H. J. Gross and H. Alberty, Biochem.
Biophys. Res. Commun. 46, 1581 (1972)
- 3.) J. Preiss, M. Dieckmann and P. Berg,
J. Biol. Chem. 236, 1748 (1961)
- 4.) J. J. Furth, J. Hurwitz, R. Krug and M. Alexander,
J. Biol. Chem. 236, 3317 (1961)
- 5.) V. Daniel and U. Z. Littauer, J. Biol. Chem. 238,
2102 (1963)
- 6.) P. Lebowitz, P. L. Ipata, M. H. Makman,
H. H. Richards and G. L. Cantoni,
Biochemistry 5, 3617 (1966)
- 7.) M. P. Deutscher, J. Biol. Chem. 245,
4225 (1970)
- 8.) G. Zubay, J. molecular Biol. 4, 347 (1962)

- 9.) S. Nishimura, F. Harada, U. Narushima and
T. Seno, *Biochim. Biophys. Acta* 142, 133 (1967)
- 10.) J. Gillam, S. Millward, D. Blew, M. von Tigerstrom,
E. Wimmer and G. M. Tener, *Biochemistry* 6, 3043 (1967)
- 11.) R. M. Hoskinson and H. G. Khorana,
J. Biol. Chemistry 240, 2129 (1965)
- 12.) R. J. Mans and G. D. Novelli,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 3, 540 (1960)
- 13.) H. J. Gross and H. Albery, *Hoppe-Seyler's*
Z. physiol. Chem. 352, 1177 (1971)
- 14.) U. L. RajBhandary, S. H. Chang, H. J. Gross,
F. Harada, F. Kimura and S. Nishimura,
Federation Proceedings 28, 409 (1969)
- 15.) H. M. Goodman, J. Abelson, A. Landy, S. Brenner
and J. D. Smith, *Nature* 217, 1019 (1968)
- 16.) H. C. Neu and L. A. Heppel, *J. Biol. Chem* 239,
2927 (1964)

- 17.) H. J. Gross and C. Raab, Biochem. Biophys.
Res. Commun.
- 18.) E. Layne in "Methods in Enzymology"
(Herausgeber L. Grossmann and K. Moldave),
Academic Press, New York 1957, Vol. III, S. 450
- 19.) H. J. Gross, F. R. Duerinck and W. C. Fiers,
Europ. J. Biochem. 17, 116 (1970)
- 20.) H. Honda, Biochim. Biophys. Acta 195, 587 (1969)
- 21.) H. Overath, F. Fittler, K. Harbers, R. Thiebe
and H. G. Zachau, FEBS Letters 11, 289 (1970)

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Dr. H. J. Gross in der Abteilung von Herrn Professor Dr. H. Dannenberg im Max-Planck-Institut für Biochemie in München in der Zeit 1970 - 1972 durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Dr. J. Brüggemann und Herrn Privat-Dozent Dr. Giesecke danke ich herzlich für das wohlwollende Interesse, das sie meiner Arbeit entgegengebracht haben.

Herrn Professor Dr. H. Dannenberg danke ich für die großzügig gewährten Arbeitsmöglichkeiten in seiner Abteilung.

Herrn Dr. H. J. Gross habe ich für die Stellung des Themas und gute Betreuung herzlich zu danken.

Frau E. Czerny und Fräulein H. Alberty gebührt mein besonderer Dank für ihre tatkräftige Hilfe bei der Durchführung meiner Versuche.

G. Lebenslauf

Am 5. Mai 1942 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Wilhelm Massmann und seiner Ehefrau Käthe, geb. Bott, in Istanbul / Türkei geboren.

Von 1948 bis Anfang 1952 besuchte ich die Volksschule in Mülheim/Ruhr und von Mitte 1952 bis Anfang 1961 das Alt- und Neusprachliche Gymnasium in Mülheim/Ruhr.

Im Sommer 1961 begann ich das Studium der Medizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn, wechselte 1967 zur Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und legte dort im August 1972 den 3. Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung ab.

